

GENE FOR CELL-SURFACE EXPRESSION OF FOREIGN PROTEINS OR PEPTIDES

Publication number: KR2003081548

Publication date: 2003-10-22

Inventor: LEE SANG YEOP (KR); CHOI JONG HYEON (KR); LEE SEUNG HWAN (KR); PARK SANG HYEON (KR)

Applicant: KOREA INST SCIENCE TECHNOLOGY (KR)

Classification:

- international: **C12N15/11; C12N15/11; (IPC1-7): C12N15/11**

- european:

Application number: KR20020019820 20020411

Priority number(s): KR20020019820 20020411

Report a data error here

Abstract not available for KR2003081548

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁷
C12N 15/11

(45) 공고일자 2004년12월20일
(11) 등록번호 10-0462832
(24) 등록일자 2004년12월10일

(21) 출원번호	10-2002-0019820	(65) 공개번호	10-2003-0081548
(22) 출원일자	2002년04월11일	(43) 공개일자	2003년10월22일

(73) 특허권자 한국과학기술원
대전 유성구 구성동 373-1

(72) 발명자 이상엽
대전광역시유성구전민동엑스포아파트212-702
최중현
서울특별시은평구불광2동163-2525/5천일맨션101호
이승환
대전광역시유성구구성동373-1
박상현
경기도성남시분당구구미동(무지개마을)2121206-2401

(74) 대리인 이한영

심사관 : 이충호

(54) 세포표면 발현용 유전자

요약

본 발명은 살모넬라에서 유래한 세포 외막 단백질 C(OmpC)를 세포표면 발현 모체로 사용하여 외래 단백질이나 펩타이드를 세포표면에 효율적으로 발현시킬 수 있는 발현벡터, 전기 발현벡터에 의하여 형질변환된 미생물 및 그를 이용하여 외래 단백질을 박테리아의 세포표면에 효율적으로 발현시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 세포 외막에 외래 단백질을 정상적인 기능을 가진 상태로 발현시킬 수 있으므로, 삽입되는 외래 유전자에 따라 생물학적 변환, 재조합 생백신, 여러 펩타이드나 항체의 선별, 중금속 제거 또는 폐수 처리에 응용할 수 있는 전세포 흡착제에 이용되는 효소 혹은 단백질을 세포표면에 안정적으로 발현시켜 지속적으로 촉매의 활성의 감소없이 안정되게 사용할 수 있는 전세포 생물변환 등의 목적에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도

도 7

색인어

세포 외막 단백질 C(OmpC), 세포표면 발현 모체

병세서

도면의 간단한 설명

도 1은 플라스미드 placKSC의 유전자 지도이다.
 도 2는 플라스미드 pT7KSC의 유전자 지도이다.
 도 3은 발현벡터 pT7KSC-H6, pT7KSC-H12 및 pT7KSC-H18의 유전자 지도이다.
 도 4는 발현벡터 pT7KSC-H6, pT7KSC-H12 및 pT7KSC-H18으로 형질변환된 재조합 대장균의 카드늄 흡착능을 보여주는 그래프이다.
 도 5는 플라스미드 pT7KSC-GFP의 유전자 지도이다.
 도 6a는 발현벡터 pT7KSC-GFP으로 형질변환된 대장균을 UV하에서 촬영한 사진이다.
 도 6b는 발현벡터 형질변환되지 않은 대장균을 UV하에서 촬영한 사진이다.
 도 7은 재조합 플라스미드 placKSC-lip의 유전자 지도이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 세포표면 발현용 유전자에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 세포표면에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 고안된 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)에서 유래한 세포 외막 단백질 C의 변형된 유전자, 전기 유전자를 세포표면 발현 모체로 사용하여 외래 단백질을 펩타이드를 세포표면에 효율적으로 발현시킬 수 있는 발현벡터, 전기 발현벡터에 의하여 형질변환된 미생물 및 그를 이용하여 외래 단백질을 박테리아의 세포표면에 효율적으로 발현시키는 방법에 관한 것이다.

1980년대 중반 스미스(Smith)가 펩타이드나 작은 단백질을 필라멘터스 파아지(filamentous phage)의 pIII와 융합하여 발현시켜 이를 표면 발현 시스템(surface-expression system)이라고 언급한 후, 미생물의 분비 기작에 대한 연구가 활발히 진행되면서 원하는 단백질을 미생물 표면에 안정적으로 발현시키는 세포표면 발현(cell surface display)이라는 새로운 분야가 등장했다. 세포표면 발현은 박테리아나 효모와 같은 미생물의 표면 단백질을 표면 발현 모체(surface anchoring motif)로 사용하여 외래 단백질을 미생물 표면에 안정적으로 발현시키는 새로운 분야이다. 처음에는 파아지의 표면이 박테리아보다 단순하기 때문에 파아지 표면에 외래 단백질을 발현시키는 연구가 먼저 진행되었으나, 파아지를 이용하는 경우, 삽입되어 표면에 발현될 수 있는 외래 단백질의 길이가 매우 제한되고 용용범위에도 한계가 있어, 점차 박테리아를 이용한 세포표면 발현에 많은 과학자들이 관심을 가지고 연구를 진행하고 있다(참조: Georgiou, G., et al., *Nature Biotechnol.*, 15:29-34, 1997).

복잡한 막구조를 가지고 있는 대장균과 같은 박테리아에서 세포표면 발현을 성공적으로 수행하기 위해서는, 우선 세포표면에 발현시키고자 하는 외래 단백질을 세포표면까지 안정적이며 효율적으로 이동시킬 수 있는 표면 발현 모체의 사용이 요구되는데, 표면 발현 모체로서 외래 단백질을 세포표면까지 보내기 위해 세포내막을 통과할 수 있도록 도와주는 매우 효율적인 분비신호 서열을 가지고 있어야 하고, 세포 외막 표면에 안정되게 부착될 수 있는 목적신호(targeting signal)를 갖추어야 하며, 동시에 큰 크기를 가지고 있는 외래 단백질도 전달이 가능하여야 하고, 많은 양을 안정적으로 발현시킬 수 있어야 한다.

지금까지 대장균의 표면 발현 모체로는 OmpA, OmpS, LamB, OprF, PhoE 등과 같은 세포 외막에 존재하는 단백질이 주로 이용되었다(참조: Agterberg, M., et al., *Gene*, 88:37-45, 1990; Lang, H., et al., *Eur. J. Bacteriol.*, 267:163-170, 2000). 이 경우, 외래 단백질을 세포표면에 돌출한 루프구조에 삽입시켜 성공적으로 표면에 발현시킬 수는 있지만, 삽입할 수 있는 단백질의 크기가 구조적으로 제한되어진다(참조: Georgiou, G., et al., *Nature Biotechnol.*, 15:29-34, 1997). 또한, 삽입된 외래 단백질의 C-말단과 N-말단이 입체적으로 가깝게 위치해야 하므로, 단백질이 큰 경우에는 단백질의 안정성이 낮아진다. 실제로 LamB 또는 PhoE의 경우 50 내지 60개 이상의 아미노산으로 이루어진 외래 단백질을 삽입하면, 구조적 제한을 가져와 안정한 막단백질을 형성하지 못하고, 대장균의 포린(porin) 세포 외막 단백질의 경우, 최고 150개의 아미노산으로 구성된 단백질이 아닌 에피토프(epitope)나 금속결합 모티프(metal binding motif) 등에 국한되어 사용되었다(참조: Stahl, S., et al., *Trends Biotechnol.*, 15:185-192, 1997; Kjaergaard, K., et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:10-14, 2000).

선택되어진 표면 발현 모체에 우리가 발현하고자 하는 외래 단백질을 융합시켜 세포표면에 발현시킬 때, 지금까지 세포표면 발현에 사용된 융합방법은 크게 세 종류가 있다: 첫 번째 방법은 표면 발현 모체의 N-터미널에 표면에 발현시키고자 하는 외래 단백질을 융합시키는 방법으로, 그램 양성세포의 경우에 해당되며 대장균과 같은 그램 음성균은 이런 시스템을 사용할 수 없다(참조: Gunneriusson, E., et al., *J. Bacteriol.*, 178:1341-1346, 1996; Stasuss, A., et al., *Mol. Microbiol.*, 21:491-500, 1996; Pozzi, G., et al., *Infect. Immun.*, 60:1902-1907, 1992); 두 번째 방법은 세포표면에 발현하고자 하는 외래 단백질을 표면 발현 모체로 사용되는 단백질 사이에 융합시키는 샌드위치 융합(sandwich fusion) 방법으로, 대장균에서 사용할 수 있으나, 이와 같은 방법은 외래 유전자의 융합이 어렵고, 발현된 외래 단백질이 활성을 상실하는 경우가 많으며, 삽입시킬 수 있는 외래 펩타이드의 크기가 최대 약 150개의 아미노산 정도로 제한된다는 것이 큰 문제라 하겠다(참조: Agterberg, M., et al., *Gene*, 88:37-45, 1990; Pallesen, L., *Microb*

iology, 141:2839-2848, 1995; Steidler, L., et al., J. Bacteriol., 175:7639-7643, 1993; Xu, Z., et al., Applied Environ. Microbiol., 65:5142-5147, 1999; Georgiou, G., et al., Nature Biotechnol., 15:29-34, 1997; Stahl, S., et al., Trends Biotechnol., 15:185-192, 1997); 세 번째 방법은 표면 발현 모체의 C-말단에 발현하고자 하는 외래 단백질을 융합시키거나 또는 C-말단 부분을 제거시키고 바로 외래 단백질을 융합(C-terminal deletion fusion)시키는 방법으로, 외래 단백질이나 펩타이드를 세포표면 발현 모체에 융합하기가 매우 쉬우며, 삽입된 외래 단백질의 활성에 대한 영향이 적다는 장점이 있으나, 상대적으로 세포표면에 표면 발현 모체가 안정하게 발현되기 어렵다는 단점이 있다.

박테리아의 분비 시스템을 응용한 세포표면 발현의 생물공학적인 응용 범위는 매우 넓은데, 이는 세포표면에 발현시키고자 하는 외래 단백질의 종류에 따라 결정된다. 우선, 병원성 유래 항원 에피토프(epitope)를 세포표면에 발현시켜 박테리아 백신을 만들 경우, 약독화된 병원성 세균이나 바이러스를 이용한 재래식 백신보다 훨씬 지속적이고 강력하게 면역 반응을 나타낸다(참조: Nguyen, T. N., et al., Gene., 128:89-94, 1993). 뿐만 아니라, 특정 단백질을 세포표면에 발현시킬 경우, 여러 펩타이드나 항체의 스크리닝을 쉽고 간단하게 수행할 수 있다(참조: Francisco, J. A. R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 91:10444-10448, 1993). 이 외에도, 특정 항원을 발현하는 박테리아를 동물에 투여하여 항체를 생산하거나, 세포표면에 금속 흡착 단백질을 발현시켜 중금속 제거 및 폐수 처리에 응용하는 전 세포 흡착제, 생물학적 변환에 이용되는 효소를 세포표면에 안정적으로 발현시켜 효소 활성의 감소없이 지속적으로 안정되게 사용할 수 있는 전세포 생물 변환 등 그 응용 가치가 매우 높다고 할 수 있다(참조: Charbit, A., et al., Gene., 70: 181-189, 1988; Sousa, C., et al., J. Bacteriol., 180:2280-2284, 1998; Richins, R., et al., Nat. Biotechnol., 15: 984-987, 1997).

유지는 자연에서 얻어지는 글리세롤 트리에스테르의 혼합물이고, 지방산은 유지의 가수분해로 얻어지는 긴사슬 카르복시산이며, 리파제는 유지를 가수분해해서 지방산과 글리세롤로 만드는 활성을 가진 효소이다. 또한, 리파제는 유지분해만이 아니라 글리세롤과 지방산을 에스테르화(esterification)하여 유지를 합성하는 반응 또는 유지를 에스테르교환(transesterification)하여 새로운 유지를 합성하는 반응을 매개하고, 많은 비자연적인 기질(unnatural substrate)의 아실화반응(acylation) 또는 탈아실화반응(deacylation)을 촉매하는데, 이러한 리파제의 촉매작용은 라세미 혼합물에 대해 고도의 광학선택성(high enantioselectivity)을 보인다. 이러한 성질을 가진 리파제를 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 세포표면 위에 발현시켜 그 활성을 감소시키지 않고 발현시켰다는 보고가 있었다(참조: Ueda, M. et al., J. Bioscience Bioeng., 90:125-136, 2000).

상기의 리파제 촉매작용을 이용하여 라세미 혼합물의 광학분해를 통해 키랄성 화합물을 제조하는 것이 활발하게 보고되었다. 그 예로서, 최근 연구가 활발히 진행되고 있는 탁솔(taxol)의 C-13 결사슬인 페닐이소세린 유도체(derivatives of phenylisoserine), 비스테로이드 소염진통제인(S)-이부프로펜(ibuprofen), 고혈압치료제인 캡토프릴(captopril) 중간체, 협심증 및 고혈압치료제인 딜티아젠펜(diltiazem) 중간체, 베타-블로커(β -blocker)의 중간체, 로쉬(Roche)사의 항우울제 중간체, 비타민 E, 광학활성 락톤 등의 화학·효소적 합성(chemoenzymatic synthesis)을 들 수 있다(참조: R. Brieva et al., J. Org. Chem., 58:1068-1075, 1993; F. X. McConville et al., In Biocatalysis, D. A. Abramowicz ed., p.167, Von Nostrand Reinhold, New York; L. Ghose et al., In Chiral reactions in heterogeneous catalysis, p.21, Plenum Press, New York; S. B. Desai et al., J. Org. Chem., 61, 1996; S. C. Mohapatra et al., Biotechnol. and Bioeng., 64:213-220, 1999; A. M. McKay, Lett. Appl. Microb., 16:1-6, 1993). 그러나, 라세미 혼합물의 광학분해를 통하여 한 종류의 광학이성질체만을 선택적으로 생산하는 기술(chirotechnology)에 상술한 리파제를 이용한 경우, 기질과의 반응 후에 반응혼합물로부터의 리파제의 회수가 용이하지 않아서 효율적인 정제와 반응의 단순화를 저해 하였고, 값비싼 리파제를 일회적인 사용으로 제한하였다.

따라서, 리파제의 용이한 회수로 효율적인 정제 및 반응공정의 단순화, 그리고 회수한 리파제를 재활용하는 경제적이고도 환경친화적인 광학이성질체 제조기술을 개발하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 경제적이고도 환경친화적인 광학이성질체 제조기술을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 미생물의 세포표면에 리파제를 발현시킬 경우, 리파제의 회수가 용이하여 경제적이고도 환경친화적으로 광학이성질체를 제조할 수 있고, 이를 위하여 살모넬라 유래의 OmpC를 표면발현 모체로 이용할 경우, 외래 단백질이나 펩타이드를 세포표면에 발현시킬 수 있는 재조합 발현백터를 제조할 수 있으며, 형질변환된 미생물에서 외래 단백질이 효율적으로 형질변환된 미생물의 세포표면에 발현됨을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

결국, 본 발명의 첫 번째 목적은 대장균 세포표면에 외래 단백질을 효율적으로 발현시킬 수 있는 표면 발현 모체의 C-말단에 원하는 외래 단백질 혹은 펩타이드 유전자가 융합된 폴리펩티드의 세포표면 발현용 재조합 유전자를 제공하는 것이다.

본 발명의 두 번째 목적은 전기 재조합 유전자를 포함하는 세포표면 발현백터를 제공하는 것이다.

본 발명의 세 번째 목적은 전기 발현백터로 형질변환된 미생물을 제공하는 것이다.

본 발명의 네 번째 목적은 전기 형질변환된 미생물을 이용하여 광학이성질체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 세포표면 발현용 유전자는 OmpC의 N-말단으로부터 5번째 루프에 이르는 아미노산 서열을 암호화하는 유전자를 포함한다.

이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

본 발명자들은 성공적인 세포표면 발현을 위해서는 표면 발현 모체가 매우 효율적인 분비신호 서열 및 세포 외막 표면에 안정되게 부착될 수 있는 목표신호(targeting signal)를 가지고 있고, 큰 크기를 가지고 있는 외래 단백질의 전달도 가능하게 하며, 많은 양을 안정적으로 발현시킬 수 있어야 한다는 가정 아래, 이와 같은 표면 발현 모체의 대상으로서 살모넬라에서 유래한 세포외막 단백질 C(OmpC)를 선택하였다.

대장균의 주 포린 단백질(major porin protein)인 세포외막 단백질 C의 경우, 21개의 분비신호 서열을 포함하여 367개 아미노산으로 구성되어 있으며, 세포외막 단백질 F(OmpF)와 더불어 배지내의 삼투압(osmolarity)에 반응하여 발현되는 단백질로서, 단위 세포당 약 10^5 개의 분자가 발현될 만큼 다량으로 발현되는 세포외막 단백질이다(참조: Mizuno, T., et al., J. Biol. Chem., 258:6932-6940, 1983).

세포외막 단백질 C의 세포막 위상(membrane topology)을 보면, 단백질의 N-말단과 C-말단이 주변세포질에 존재하고, 8개의 루프(loop)는 세포외막 바깥쪽으로, 7개의 루프는 주변세포질쪽으로 돌출되어 있다(참조: Puente, J., et al., Gene, 156:1-9, 1995). 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)에서 유래한 세포외막 단백질 C의 경우, 세포 외막 바깥쪽으로 돌출되어 있는 8개의 루프 중 4번째와 6번째 루프에 각각 로타바이러스(rotavirus) VP4 캡시드 단백질 에피토프(epitope) RV160(22개의 아미노산)와 RV252(28개의 아미노산)를 성공적으로 발현시켰다(참조: Puente, J., et al., Gene, 156:1-9, 1995).

이에, 본 발명자들은 살모넬라에서 유래한 세포외막 단백질 C(OmpC)의 N-말단으로부터 세포외막 바깥쪽으로 돌출된 8번째 루프까지의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자, 바람직하게는 N-말단으로부터 세포외막 바깥쪽으로 돌출된 7번째 루프까지의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자, 가장 바람직하게는 최소한 N-말단으로부터 세포외막 바깥쪽으로 돌출된 5번째 루프까지의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자를 포함하는 OmpC의 변형된 재조합 유전자를 작제하고, 이의 C-말단 부위에 외래 단백질 또는 펩타이드를 암호화하는 유전자를 융합시킴으로써, 신규한 융합 단백질을 생산하고자 하였다. 이때, 사용되는 외래 단백질 또는 펩타이드가 특별히 제한되는 것은 아니나, 단백질, 효소, 효소 저해제, 모노클로날 항체, 항원 및 호르몬으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 1종을 사용함이 바람직하다. 우선, 살모넬라에서 유래한 세포외막 단백질 C 유전자를 확보하기 위해서, 살모넬라 티피뮤리움의 염색체를 표적 DNA로 사용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하였다. 이렇게 증폭된 약 1100 bp 크기의 DNA 절편을 아가로스 젤 전기영동하여 수득하고, 유도성 T7 또는 lac 프로모터를 포함하는 플라스미드에 삽입하여, 재조합 플라스미드 plackSC 및 pT7KSC를 제조하였다. 전기 제조된 재조합 플라스미드 plackSC와 pT7KSC는 lac 또는 T7 프로모터에 의하여 살모넬라에서 유래한 세포외막 단백질 C를 발현시킨다. 아울러, 세포표면에 발현될 모델 단백질 혹은 펩타이드는 세포외막 바깥쪽으로 돌출되어 있는 8개의 루프 중 7번째 루프에 존재하는 제한효소 PstI 이후의 모든 유전자를 절단하고, 그 절단 부위에 삽입하고자 하였다.

본 발명의 일 실시예에 따르면, 예시적으로 대장균 세포표면에 발현시킬 대상 펩타이드로 6개의 히스티딘(6His)으로 구성된 폴리-히스티딘(poly-His) 링커(linker) 펩타이드를 사용하였는데, 이 대상 펩타이드는 Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} 및 Pb^{2+} 등의 2가 메탈 이온에 대한 킬레이터(chelator)로 작용하며, 중금속 제거를 위한 생물흡착제로서 사용할 수 있기 때문이다. 중합효소 연쇄반응에 의하여 증폭된 DNA중에서 아가로스 젤 전기영동법으로 약 72 bp 크기의 DNA 절편을 수득한 후, 재조합 발현벡터 pT7KSC의 PstI 및 BamHI 제한효소 부위에 삽입시켜 폴리-히스티딘 링커가 6, 12 및 18개 삽입된 재조합 발현벡터 pT7KSC-H6, pT7KSC-H12 및 pT7KSC-H18를 제조하였다.

상기에서 제조된 재조합 발현벡터 pT7KSC-H6, pT7KSC-H12, pT7KSC-H18를 대장균에 도입하고, 이 형질변환체를 배양하여, 발현유도인자, 예를 들면 IPTG(isopropyl- β -thiogalactoside)를 첨가하여 발현을 유도한 다음, 배양액을 일정량 채취하여 세포 외막 단백질을 분획하였다. 분획한 단백질들은 SDS-PAGE(sodium-dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)로 분석한 결과, 살모넬라 티피뮤리움 유래 세포외막 단백질 C에 폴리-히스티딘 링커가 성공적으로 삽입되어 세포표면에 발현되었음을 확인하였다.

이어, 재조합 발현벡터 pT7KSC-H6, pT7KSC-H12, pT7KSC-H18를 가지는 살모넬라 티피뮤리움이 실제로 중금속을 얼마나 흡착할 수 있는지를 카드뮴(Cd^{2+})을 흡착시킨 후, 원자분석 시스템(atomic analysis system)을 이용하여 분석하였다. 각 재조합 발현벡터로 형질변환된 대장균에 각각 단위 그림 세포 건조 중량당 $34.2 \mu\text{mol}$ 의 Cd^{2+} 이온을 흡착시킨 결과, 과거 소사(Sousa) 등이 보고한 카드뮴 흡착결과와 비교할 때, 매우 높은 효율로 카드뮴을 흡착한 것을 확인할 수 있었다(참조: Sousa, C., et al., Nature Biotechnol., 14:1017-1020, 1996). 따라서, 본 발명에서 개발한 세포표면 발현 모체를 폐수나 쓰레기 등에 있는 중금속을 제거하는데 이용할 수 있을 것이다.

본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 펩타이드 뿐만 아니라 단백질이 효율적으로 대장균 세포표면에 발현되는지 알아보기 위하여 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP)을 모델 단백질로 선택하여 확인하였다. GFP는 아쿠오레아 빅토리아(*Aequorea victoria*)에서 유래한 238개의 아미노산으로 구성된 약 2.7 kDa 크기를 가진 화학적 발광(chemiluminescent) 단백질로서 11개의 베타-시트(β -sheet)구조를 포함하고, 그 3차원 구조가 세포외막 단백질의 구조와 매우 유사하다. 전기 단백질은 크로모포어(chromophore)에 해당되는 65 내지 67번째 아미노산(wild type)의 경우 Ser-Thr-Gly의 종류에 따라 크게 6종류로 나뉘고, 각각의 종류마다 방사(emission) 및 여기(excitation) 파장이 달라지는 특성이 있으며, 그 3차원 구조가 바뀌면 보통 UV하에서 형광을 띠지 않는다. 본 발명자들은 전기 제조된 pT7KSC 재조합 플라스미드에 GFP 유전자를 삽입하여 발현벡터를 작제하고, 이를 이용하여 대장균을 형질변환시킨 다음, IPTG를 첨가하며 배양하여 발현을 유도하고, 배양액을 일정량 채취하여 세포 외막 단백질을 수득하였다. 수득한 전기 단백질을 SDS-PAGE로 분석하고, 항-GFP 항체를 이용하여 면역블랏(immunoblot)을 수행한 결과, 살모넬라 티피뮤리움 유래 세포외막 단백질 C에 GFP가 성공적으로 삽입되어 세포표면에 발현되었음을 확인하였다. 이어, 세포표면에 발현된 단백질의 활성이 정상적으로 유지되는지 확인하기 위하여, UV 하에서 녹색의 형광을 띠는지 확인해 본 결과, 대장균 세포표면에 발현된 GFP는 밝은 녹색의 형광을 띠었으므로, 본 벡터 시스템은 펩타이드

나 단백질을 세포표면 밖에서 효율적으로 발현시킴을 확인할 수 있었다.

본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 전기 개발된 세포표면 발현벡터에 리파제를 퓨전시키고, 이를 라세미 혼합물의 광학분할을 통한 키랄성 화합물의 제조에 응용하고자 하였다. 종래에는 정제된 순수 리파제의 촉매 작용을 이용하여 라세미 혼합물을 광학분할하여 페닐이소세린 유도체(derivatives of phenylisoserine), 캡토프릴(captopril) 중간체, (S)-이부프로펜(ibuprofen), 광학활성 락톤과 같은 키랄성 화합물을 제조하였다(참조: R. Brieva et al., J. Org. Chem., 58:1068-1075, 1993; L. Ghose et al., In Chiral reactions in heterogeneous catalysis, p. 21, Plenum Press, New York; A. M. McKay, Lett. Appl. Microb., 16:1-6, 1993). 그러나, 이와 같은 방법들은 기질과의 반응 후에 반응혼합물로부터 리파제를 회수하는데 어려움이 있어, 효율적인 정제와 반응의 단순화를 수립할 수 없었을 뿐만 아니라, 값비싼 리파제를 일회적인 사용으로 제한하였다.

이에, 본 발명자는 기존 리파제의 촉매 작용을 유지하면서 단점을 보완할 수 있는 신규 리파제 세포표면 발현 시스템을 확립하고, 이를 이용하여 라세미 에스테르 화합물로부터 키랄성 알코올, 키랄성 유기산, 키랄성 에스테르의 제조방법을 확립하였다. 즉, 전기 제작된 placKSC 재조합 유전자에 리파제 유전자를 삽입하여 발현벡터 placKSC-lip을 작성하고, 이를 이용하여 대장균을 형질변환시켰으며, 전기 형질변환체를 배양하면서 IPTG를 첨가하여 리파제 융합단백질의 발현을 유도하여, 세포표면에 리파제가 발현되도록 하였다. 전기 발현된 리파제와 라세미 에스테르 화합물을 반응시켜서 키랄성 화합물을 제조할 수 있는데, 이때 라세미 에스테르 화합물은 특별히 제한되는 것은 아니나, 하이드록시카복실산, 알킬, 에스테르 또는 락탐을 사용함이 바람직하다. 본 발명에서는 전기 발현된 리파제와 라세미 3-하이드록시부티르산 에틸 에스테르를 반응시켜 카파페넴계 항생제 출발물질인 키랄성 (S)-(+)-3-하이드록시부티르산 에틸 에스테르((S)-(+)-3-hydroxybutyrate ethyl-ester)와 (R)-(+)-3-하이드록시부티르산((R)-(+)-3-hydroxybutyric acid)을 수득하고, 세포표면에 발현된 리파아제를 간단한 방법으로 회수하여 효율적인 정제 및 반응공정의 단순성을 제공하는 경제적이고도 환경친화적인 키랄성 화합물을 제조할 수 있었다.

또한, 전기 발현된 리파제를 라세미 베타-락탐인 라세미 시스-3-아세톡시-4-페닐아제티딘-2-온(racemic cis-3-acetoxy-4-phenylazetidin-2-one)과 반응시켜 키랄성 에스테르 및 키랄성 유기산을 수득하고, 세포표면에 발현된 리파제는 반응 혼합물로부터 원심분리하여 쉽게 분리하였다.

이상에서 보듯이, 본 발명의 살모넬라 유래의 OmpC를 표면발현 모체로 이용한 외래 단백질이나 펩타이드를 세포표면에 발현시킬 수 있는 재조합 발현벡터는 여러 가지 외래 단백질이나 펩타이드를 원래의 기능을 유지시키면서도, 효율적으로 형질변환체의 세포표면에 발현시킬 수 있음을 확인하였다. 이에, 본 발명자들은 상기 제조된 여러 가지 발현벡터 중에서, GFP를 발현시킬 수 있는 pT7KSC-GFP를 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 제조된 형질변환체를 대장균 BL21(DE3)/pT7KSC-GFP(Escherichia coli BL21(DE3)/pT7KSC-GFP)라 명명하고, 이를 2000년 11월 30일자로 국제기탁기관인 생명공학연구원(KRIBB) 유전자은행(KCTC, 대한민국 대전광역시 유성구 어은동 소재)에 기탁번호 KCTC-0897BP로 기탁하였으며, 리파제를 발현시킬 수 있는 placKSC-lip를 대장균 MC4100에 도입하여 제조된 형질변환체를 대장균 MC4100/placKSC-lip(Escherichia coli MC4100/placKSC-lip)라 명명하고, 이를 2000년 11월 30일자로 동일한 국제기탁기관인 유전자은행에 기탁번호 KCTC-0898BP로 기탁하였다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 특히, 본 발명의 발현벡터 placKSC와 pT7KSC는 외부 유전자로서 하기 실시예에서 기술하고 있는 폴리-히스티딘 링커 및 GFP 유전자 뿐만 아니라, 각종 외래 단백질이나 펩타이드의 유전자를 도입하여 그의 발현에 이용될 수 있다. 따라서, 재조합 발현벡터 placKSC와 pT7KSC에 각종 유전자가 삽입된 재조합 발현벡터 또한 본 발명의 범주에 속한다고 보아야 할 것이다.

실시예 1 : 재조합 발현벡터 placKSC의 제조

lac 프로모터 상에서 세포 외막 단백질을 발현시키기 위하여 lac 프로모터를 가진 재조합 플라스미드 pJHlacK를 제조하였다.

우선, lac 프로모터와 lac 프로모터를 보다 효율적으로 조절하기 위한 lacI 유전자를 수득하였다. 즉, 재조합 플라스미드 pUC19는 lac 프로모터와 lacI 유전자를 가지고 있다(참조: Yanisch-Perron C. et al., Gene, 33:103-119, 1985). 이 pUC19 플라스미드를 주형으로 사용하고, 하기의 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄반응(첫번째 변성 94℃ 5분, 두번째 변성 94℃ 45초, 교잡 50℃ 50초, 연장 72℃ 1분 10초, 30회 반복)을 수행하였다.

primer1 5'-GGAATTCATATGTGTTTCCTGTGTGAAATTGTT-3 (서열번호 1)

primer2 5'-TGCTCACATGTTCTTTTCCTG-3 (서열번호 2)

아가로즈 겔 전기영동법으로 전기 중합효소 연쇄반응 방법으로 수득한 절편에서 약 347bp 크기의 DNA 절편을 분리하고, 제한효소 NdeI과 AflIII으로 절단하였다. 이를, pET3a 플라스미드를 NdeI과 AflIII로 절단하여 수득한 2438bp의 DNA 절편과 연결시켜 약 2765bp 길이의 재조합 플라스미드 pJHlac을 수득하였다(참고: Conner G. E. and Udey J. A., DNA Cell Biol., 9(1):1-9, 1990). 이어, pJHlac 플라스미드를 제한 효소 DraI과 EcoRI으로 절단하고, 카나마이신 유전자를 연결시킨 후, 일렉트로포레이션(electroporation) 방법으로 대장균 XL1-Blue에 도입하여, 형질변환시킨 다음, 카나마이신(10 µg/L)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별하고, 이로부터 약 2568bp 길이를 가진 pJHlac K 재조합 플라스미드를 수득하였다. 이때, 사용된 카나마이신 유전자는 플라스미드 pACYC177를 주형으로 하고, 하기 프라이머를 사용하여, 중합효소 연쇄반응(첫번째 변성 94℃ 5분, 두번째 변성 94℃ 45초, 교잡 51℃ 50초, 연장 72℃ 50초, 30회 반복)을 수행하고, 아가로즈 겔 전기영동법에 의하여 전기 중합효소 연쇄반응 방법으로 얻어진 DNA 절편으로부터 분리한 약 930bp 크기의 DNA 절편이다(참고: Chang A. C. Y. and Cohen S. N., J. Bacteriol., 134:1141-1156, 1978).

primer3 5'-GCGGTACCTTTAAAGCCACGTTGTGTCTCAAA-3 (서열번호 3)

primer4 5 -CGAATTCTTAGAAAACTCATCGAGCA-3 (서열번호 4)

한편, 살모넬라 티피뮤리움의 세포외막 단백질 C(OmpC) 유전자를 확보하기 위하여, 살모넬라 티피뮤리움 염색체 DNA를 주형으로 하고, 하기의 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄반응(첫번째 변성 94℃ 7분, 두번째 변성 94℃ 1분, 교잡 44℃ 2분, 연장 72℃ 3분, 33회 반복)을 수행하였다.

primer5 5 -GGAATTCCATATGAAAGTTAAAGTACTG-3 (서열번호 5)

primer6 5 -CCGGGATCCTTATTAGAACTG GTAAACCAG-3 (서열번호 6)

아가로즈 겔 전기영동법으로 전기 중합효소 연쇄반응 방법으로 수득한 절편에서 약 1100bp 크기의 DNA 절편을 분리하고, 제한효소 NdeI과 BamHI으로 절단하였다. 이를, lac 프로모터를 포함하는 플라스미드 pHJlacK를 제한효소 NdeI과 BamHI으로 절단하여 수득한 DNA 절편과 연결시켜 재조합 플라스미드를 수득하고, 일렉트로포레이션 방법으로 대장균 XL1-Blue에 도입하여 형질변환시킨 다음, 카나마이신(10μg/L)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별하고, 이로부터 placKSC 재조합 플라스미드를 수득하였다(참조: 도 1).

실시예 2 : 재조합 발현벡터 pT7KSC의 제조

T7 프로모터 상에서 세포 외막 단백질을 발현시키기 위하여, T7 프로모터를 가진 재조합 플라스미드 pT7KSC를 제조하였다. 즉, 유도성의 강력한 T7 프로모터를 포함하는 플라스미드 pET3a를 제한 효소 EcoRI와 Dra I으로 절단하여 약 3.2 kbp 길이의 DNA 절편을 수득하고, 선택표지인 카나마이신 유전자를 실시예 1과 동일한 방법으로 삽입시킨 후, 일렉트로포레이션 방법을 이용하여 대장균 XL1-Blue에 도입 하여 형질변환시켰다. 형질변환된 균주는 카나마이신(10μg/L)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었고, 이로부터 pT7K 재조합 플라스미드를 수득한 다음, 전기 수득한 재조합 플라스미드에 살모넬라 티피뮤리움 세포 외막 단백질 C를 삽입시켰다.

즉, 실시예 1에서 수득한 살모넬라 티피뮤리움 세포외막 단백질 C의 DNA 절편과 재조합 플라스미드 pT7K 유전자를 두 가지의 제한효소 NdeI과 BamHI으로 절단한 다음, 이들을 연결시키고 일렉트로포레이션 방법을 이용하여 대장균 XL1-Blue에 도입하여 형질변환시켰다. 형질변환된 균주는 카나마이신(10μg/L)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었고, 이로부터 pT7KSC 재조합 플라스미드를 수득하였다(참조: 도 2).

실시예 3 : 재조합 발현벡터 pT7KSC-H6, pT7KSC-H12, pT7KSC-H18의 제조

세포표면에 발현시킬 모델 펩타이드로 폴리-히스티딘(poly-His) 펩타이드를 사용하였는데, 1개의 링커(linker) 세트(set)는 6개의 히스티딘으로 구성되어 있으며, 이를 제조하기 위하여, 하기의 프라이머를 사용하여 1차로 중합효소 연쇄반응(첫번째 변성 94℃ 5분, 두번째 변성 94℃ 30초, 교잡 56℃ 30초, 연장 72℃ 30초, 10회 반복), 2차로 중합효소 연쇄반응(변성 94℃ 30초, 교잡 68℃ 30초, 연장 72℃ 30초, 20회 반복)을 수행하였다.

primer7 5 -GATAGATATCCTGCAGGTCGACCCAAGCGGACATCACCATCATCACCAT-3 (서열번호 7)

primer8 5 -CCGGGATCCTTATTACTCGAGACCAGAATGGTGATGATGGTGATG-3 (서열번호 8)

아가로즈 겔 전기영동법으로 전기 중합효소 연쇄반응 방법으로 수득한 절편에서 약 72bp 크기의 DNA 절편을 분리하였는데, 전기 분리된 폴리-히스티딘 펩타이드 유전자의 5 -말단에는 PstI과 Sall 제한효소 자리가 존재하며, 3 -말단에는 XhoI과 BamHI 제한효소 자리가 존재한다.

전기 수득한 DNA 절편을 PstI과 BamHI 제한효소로 절단하고, 이를 실시예 2에서 제조한 pT7KSC 재조합 발현벡터에 삽입시킨 후, 일렉트로포레이션 방법을 이용하여 대장균 XL1-Blue에 도입하여 형질변환시켰다. 형질변환된 균주는 카나마이신(50μg/L)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었고, 이로부터 pT7KSC-H1 재조합 발현벡터를 수득하였다. 전기 재조합 발현벡터는 6개의 히스티딘으로 구성된 폴리-히스티딘 펩타이드 1개의 세트로 구성된 유전자를 포함한다.

이어, 폴리-히스티딘 펩타이드 2개의 세트로 구성된 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터 pT7KSC-H2를 제조하기 위해서, 전기 중합효소 연쇄반응을 통해 수득한 폴리-히스티딘 펩타이드 유전자를 제한효소 Sall과 XhoI으로 절단하고, pT7KSC-H1 재조합 발현벡터에 삽입시킨 후, 일렉트로포레이션 방법을 이용하여 대장균 XL1-Blue에 도입하여 형질변환시켰다. 형질변환된 균주는 카나마이신(50μg/L)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었고, 이로부터 pT7KSC-H2 재조합 발현벡터를 수득하였다. 전기 재조합 발현벡터는 6개의 히스티딘으로 구성된 폴리-히스티딘 펩타이드 2개의 세트로 구성된 유전자를 포함한다.

상기와 같은 방법으로 각각 폴리-히스티딘 펩타이드 6개, 12개 또는 18개를 포함하는 유전자를 가진 재조합 발현벡터 pT7KSC-H6, pT7KSC-H12 또는 pT7KSC-H18을 제조하였다(참조: 도 3).

실시예 4 : pT7KSC-H18 융합 단백질의 발현

실시예 3에서 제작된 재조합 발현벡터 pT7KSC-H18로 형질변환된 대장균 BL21(DE3)에서 모델 단백질이 융합된 살모넬라 티피뮤리움 세포 외막 단백질 C의 발현을 SDS-PAGE 방법을 이용하여 확인하였다. 즉, OmpC-(6His)_n 융합 단백질의 발현 정도를 조사하기 위하여 재조합 대장균들을 LB 액체 배지 50mL가 담긴 250mL 삼각 플라스크에 접종하고, IPTG(isopropyl-β-thiogalactoside)를 첨가하여 유전자 발현을 유도하면서 30℃에서 배양하였다. 이때, 유전자 발현 유도는 분광광도계로 600nm 파장에서 측정한 광학밀도(O.D.)가 0.6일 때 0.01mM의 IPTG를 첨가하여 수행하였다.

발현 유도 4시간 후, 배양액 3mL씩을 채취하여 세포 외막 단백질을 다음과 같은 방법으로 분획하였다: 배양액 3mL를 4℃에서 6000rpm으로 5분동안 원심분리 한 후, 침전물을 수득하여 1mL Na₂HPO₄ (pH 7.2) 완충용액으로 한 번 세척한 다음, 다시 4℃에서 6000rpm으로 5분 동안 원심분리하고, Na₂HPO₄ (pH 7.2) 완충용액 0.5mL에 현탁하였다. 이어, 현탁한 용액을 초음파 처리(sonication) 하여 현탁액 속의 모든 세포를 파쇄하고, 실온에서 12000rpm으로 2분동안 원심분리하여 세포 파편(debris)이 제거된 상층액을 수득하였다. 전기 상층액을 실온에서 12000rpm으로 30분동안 원심분리한 후, 0.5mL 인산완충용액(0.5%(w/v) sarcosyl, 10mM Na₂HPO₄, pH 7.2)에 현탁하여 세포막 단백질 분획을 수득하였다. 세포막 단백질 분획을 37℃에서 30분동안 방치한 후, 4℃에서 12000rpm으로 30

분동한 원심분리하여 불용상 분획을 수득하고, 인산완충용액(10mM Na₂HPO₄, pH 7.2)으로 세척한 다음, 50 μ l PBS(0.274M NaCl, 0.041M Na₂HPO₄, 0.047M KH₂PO₄, 0.005M KCl, pH 7.4) 용액에 현탁하여 세포 외막 단백질 분획 시료 용액을 준비하였다(참조: Puenete, J.L., *et al.*, *Gene*, 156:1-9, 1995). 상기 시료 용액을 SDS-PAGE로 분석한 결과, pT7KSC-H18은 성공적으로 살모넬라 세포외막 단백질 C에 삽입되어 살모넬라의 세포외막에 발현되었음을 알 수 있었다.

실시예 5 : 재조합 발현벡터 pT7KSC-H6, pT7KSC-H12 또는 pT7KSC-H18을 가지는 재조합 대장균의 증균속(카드늄) 흡착능비교

실시예 3에서 제조한 재조합 발현벡터 pT7KSC-H6, pT7KSC-H12 또는 pT7KSC-H18을 가지는 형질변환체가 세포표면에 히스티딘 링커가 발현되지 않는 재조합 발현벡터 pT7KSC를 가지는 형질변환체에 비하여 실제로 증균속을 얼마나 흡착할 수 있는지 비교하였다. 즉, pT7KSC, pT7KSC-H6, pT7KSC-H12 또는 pT7KSC-H18을 포함하는 각 형질변환체를 실시예 4와 동일한 조건으로, 세포를 각각 배양하여 유도 발현시키고, 2시간이 경과하면 세포를 0.85%(w/v) NaCl 용액으로 2번 세척한 후, 세포의 최종 농도가 분광광도계로 600nm 파장에서 측정한 광학밀도(O.D.)가 5.0이 되도록 0.85%(w/v) NaCl 용액에 농축하였다. 여기에 동일한 부피의 50ppm(0.85%(w/v) NaCl 용액, pH 5.8) 농도를 가진 카드뮴클로라이드(CdCl₂)를 첨가한 후, 이 혼합 용액을 25℃에서 교반하며 24시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후에 다시 세포를 0.85%(w/v) NaCl 용액으로 2번 세척한 후, 실온에서 70%(w/v) 질산(nitric acid) 용액을 첨가하여 완전히 분해시켰다. 이렇게 얻어진 시료를 공기-아세틸렌 불꽃(air-acetylene flame)과 할로우 음극 램프(hollow cathode lamp)를 이용한 원자 분석 시스템(atomic analysis system; Perkin-Elmer 3100, Norwalk, CT, USA)을 이용하여 분석하고, 용액속의 카드뮴 농도를 정량하였다(참조: 도 4). 이때, 사용한 파장은 228.2nm이고, 슬릿 폭(slot width)은 0.7nm 이었다. 도 4에서 보듯이, pT7KSC로 형질변환된 미생물에 비하여 히스티딘 링커가 세포표면에 발현되는 재조합 발현벡터로 형질변환된 미생물은 히스티딘 링커의 수가 증가함에 따라 흡착되는 카드뮴 이온의 농도가 높아짐을 알 수 있었다. 이는, 소사(Sousa) 등의 보고와 비교할 때, 본 발명의 형질변환된 대장균이 보다 높은 효율로 카드뮴을 흡착함을 알 수 있었다(참조: Sousa, C., *et al.*, *Nature Biotechnol.*, 14:1017-1020, 1996).

실시예 5 : 재조합 발현 벡터 pT7KSC-GFP의 제조 및 GFP의 발현

실시예 2에서 제조한 재조합 플라스미드 pT7KSC에 모델 단백질로서 약 27 kDa 크기를 가지는 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP)을 부착하여 세포표면에 발현시키기 위하여 pT7KSC-GFP 재조합 발현 벡터를 제조하였다. 즉, GFP 유전자를 얻기 위해 플라스미드 pGFPuv를 주형으로 하고, 하기의 프라이머를 사용하여 1차 중합효소 연쇄반응(첫번째 변성 94℃ 5분, 두번째 변성 94℃ 30초, 교잡 54℃ 30초, 연장 72℃ 30초, 10회 반복)을 수행하고, 다시 2차로 중합효소 연쇄반응(변성 94℃ 30초, 교잡 60℃ 30초, 연장 72℃ 30초, 20회 반복)을 수행하였다(참조: Cramer, A., *Nature. Biotechnol.*, 14:315-319, 1996).

primer9 5'-AACTGCAGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTC-3 (서열번호 9)

primer10 5'-CGGGATCCTTATTTGTAGAGCTCATCCAT-3 (서열번호 10)

아가로즈 젤 전기영동법을 이용하여, 중합효소 연쇄반응 방법으로 수득한 DNA 절편으로부터 5 -말단에는 PstII 제한효소 자리가 존재하고, 3 -말단에는 BamHI 자리가 존재하는 약 700bp 크기의 DNA 절편인 GFP 단백질을 유전자를 수득하였다.

전기 수득한 GFP 단백질을 PstI과 BamHI 제한효소로 절단하고, pT7KSC 재조합 발현벡터에 삽입시킨 다음, 일렉트로포레이션 방법을 이용하여 대장균 XL1-Blue에 도입하여 형질변환시켰다. 형질변환된 균주는 카나마이신(50 μ g/L)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었고, 이로부터 pT7KSC-GFP 재조합 발현벡터를 수득하였다(참조: 도 5). 이어, 전기 발현벡터를 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 형질변환체를 제조하고, 이를 LB 액체 배지 50mL가 담긴 250mL 삼각 플라스크에 접종하여, IPTG로 발현을 유도하며, 30℃에서 배양하였다. 이때, 발현 유도는 분광광도계로 600nm 파장에서 측정한 광학밀도(O.D.)가 0.6일 때 0.01mM의 IPTG를 첨가시킴으로써 행하였다. 각 시료로 실시예 4의 방법으로 SDS-PAGE를 수행하고, 이를 분석한 결과, pT7KSC-GFP는 성공적으로 살모넬라 세포외막 단백질 C에 삽입되어 살모넬라의 세포외막에 발현되었음을 알 수 있었다. 또한, 전기 SDS-PAGE 젤 전기영동 결과를 보다 정확히 하기 위하여, 이뮤노블랏을 수행한 결과, GFP 단백질이 성공적으로 대장균의 세포 외막에서 발현되었음을 알 수 있었다.

또한, 발현된 GFP가 정상적인 기능을 수행할 수 있도록 발현되었는지를 확인하기 위하여, GFP가 세포표면에 발현된 형질변환체에 UV를 조사하여, GFP가 정상적으로 발광하는지 알아보았다. 이때, 대조군으로는 형질변환되지 않은 BL21(DE3)을 사용하고, UV는 366nm의 파장으로 조사하였다(참조: 도 6). 도 6은 366nm 파장의 UV 하에서 pT7KSC-GFP에 의해 형질 변환된 대장균 BL21(DE3)와 대조군을 관찰한 사진인데, 도 6a는 실험군을 나타내고, 도 6b는 대조군을 나타낸다. 도 6에서 보듯이, UV조사시 대조군은 녹색 빛이 발광되지 않으나, 실험군은 밝은 녹색으로 발광하므로, 세포표면에 발현된 GFP 단백질이 활성화된 상태를 알 수 있었다.

따라서, 전기의 표면 발현 벡터를 이용하여 성공적으로 대장균 세포표면에 단백질을 발현시켰음을 알 수 있다.

본 발명자들은 GFP를 발현시킬 수 있는 pT7KSC-GFP를 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 제조된 형질변환체를 대장균 BL21(DE3)/pT7KSC-GFP(*Escherichia coli* BL21(DE3)/pT7KSC-GFP)라 명명하고, 이를 2000년 11월 30일자로 국제기탁기관인 생명공학연구원(KRIBB) 유전자은행(KCTC, 대한민국 대전광역시 유성구 어은동 소재)에 기탁번호 KCTC 0897BP로 기탁하였다.

실시예 6 : 리파제를 세포표면 발현하는 재조합 발현벡터 placKSC-lip의 제조 및 형질변환체의 제조

리파제를 세포표면 발현하는 재조합 플라스미드를 제조하기 위하여 우선 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*)의 리파제 유전자를 다음과 같이 수득하였다. 즉, 슈도모나스 플루오레스센스의 염색체 DNA를 주형으로 하

고, 하기 프라이머를 사용하여, 중합효소 연쇄반응(첫번째 변성 94℃ 5분, 두번째 변성 94℃ 45초, 교잡 60℃ 45초, 연장 72℃ 1분 10초, 30회 반복)을 수행하였다

primer11 5'-ACCTGCAGATCACGTTGTATACCTATCACA-3 (서열번호 11)

primer12 5'-GCGGATCCAAACTCAGCACCGTATCG-3 (서열번호 12)

아가로즈 젤 전기영동법을 이용하여, 중합효소 연쇄반응 방법으로 수득한 DNA 절편으로부터 약 1.4kbp 크기의 DNA 절편인 리파제 유전자를 수득하였다. 전기 리파제 유전자를 PstI과 BamHI으로 절단하고, placKSC에 삽입시켜서, 재조합 발현벡터 placKSC-lip를 제조하고, 일렉트로포레이션 방법을 이용하여 대장균 MC4100[*F* - *araD139* Δ (*argF-lac*)U169 *rpsL150(strr)* *relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR*]과 XL1-Blue[*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac F* [*proAB+ lacIq lacZ* Δ M15 *Tn10(tet^r)*]]에 도입하여 형질변환 시켰다. 형질변환된 균주는 카나마이신(10 μ g/L)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었고, 선별된 균주를 LB 액체배지에서 배양하여 -80℃ 냉동고에 보관하였다(참조: 도 7).

실시예 7 : 세포표면발현된 리파제를 이용한 라세미 3-하이드록시부탄산 에틸 에스테르의 광학분할

실시예 6에서 제조된 형질변환체를 카나마이신(30g/L)이 함유된 100mL의 LB 액체배지가 담긴 250 mL 삼각플라스크에 접종하여 30℃에서 8시간 동안 배양하고, 상기 배양액의 1mL을 취하여 카나마이신(30g/L)이 첨가된 100mL의 LB 액체배지가 담긴 250mL 삼각플라스크에 다시 접종하여 30℃에서 배양하였다. 분광광도계로 600nm 파장에서 측정된 흡광도가 0.7일 때 20%(w/v) IPTG를 첨가하여 유전자 발현을 유도하였다. 발현유도 5시간 경과 후, 6000rpm에서 7분 동안 배양액을 원심분리 하여 세포를 수득하고, 세포를 0.1M 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)으로 세척하였으며, 3mL의 상기 완충용액으로 재현탁한 다음, 10mL 플라스크에 넣고 20mg의 라세미 3-하이드록시부탄산 에틸 에스테르를 첨가하고, 24시간동안 교반하며 반응시켰다. 이어, 6000rpm에서 7분 동안 원심분리하여 세포를 제거하고, 상등액을 수득한 다음, 10mL의 클로로포름으로 5번 추출하고, 진공 회전식 증류농축기를 사용하여 용매를 제거한 후, 키랄성 (S)-(+)-3-하이드록시부탄산 에틸 에스테르 8mg(수율 40%)을 수득하였다.

[α]_D +25° (c 1, CHCl₃);

IR(neat) 3448, 2979, 2936, 2909, 1735, 1719 cm⁻¹;

¹H NMR(CDCl₃) δ 1.23(d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃CH(OH)),

1.26(t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃CH₂O), 2.39-2.51(m, 2H, CH₂CO),

3.15(s, OH), 4.15-4.23(m, 3H, OCH₂amp; OCH₂);

¹³C NMR(CDCl₃) δ 14.19, 22.47, 42.86, 60.67, 64.27, 173.16;

CIMS, m/z 132(M⁺), 86(base).

실시예 8 : 세포표면에 발현된 리파제를 이용한 라세미 베타-락탐, 라세미 시스-3-아세톡시-4-페닐아제티딘-2-온의 광학분할

실시예 7과 동일한 방법으로 세포를 수득하고, 3mL의 0.1M 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 현탁시킨 다음, 20mg의 라세미 베타-락탐, 라세미 시스-3-아세톡시-4-페닐아제티딘-2-온(racemic cis-3-acetoxy-4-phenylazetidin-2-one)을 첨가하고, 24시간 동안 교반하며 반응시켰다. 이때, 반응시료를 박막크로마토그래피(TLC)에 적용하여(클로로포름:에틸아세테이트:헥산=3:2:3(v:v:v)) 반응의 진행도를 확인하였다.

반응 후, 6000rpm에서 7분 동안 원심분리하여 세포를 제거하고, 상등액을 수득하여, 10mL의 에틸아세테이트로 5번 추출하고, 진공 회전식 증류농축기를 이용하여 용매를 제거한 다음, 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 통하여 키랄성 베타-락탐, 8mg의 (-)-시스-3-하이드록시-4-페닐아제티딘-2-온((-)-cis-3-hydroxy-4-phenylazetidin-2-one)(수율 40%)과 6mg의 (-)-시스-3-아세톡시-4-페닐아제티딘-2-온((-)-cis-3-acetoxy-4-phenylazetidin-2-one)(수율 30%)을 수득하였다.

(-)-시스-3-하이드록시-4-페닐아제티딘-2-온

[α]_D -130° (c 0.5, CH₃OH);

¹H NMR(CDCl₃ amp; DMSO-d₆) δ 3.60(s, 1H, OH),

4.95(d, *J* = 4.7 Hz, 1H, C3H), 5.88(d, *J* = 4.7 Hz, 1H, C4H),

6.22(s, 1H, NH), 7.27-7.40(m, 5H, ArH);

¹³C NMR(CDCl₃ amp; DMSO-d₆) δ 58.6, 79.1, 127.6, 128.1, 137.1, 170.5;

CIMS, m/z 163(M⁺), 91(base).

(-)-시스-3-아세톡시-4-페닐아제티딘-2-온

[α]_D -30° (c 1, CHCl₃); IR (KBr) 3200, 1750, 1720 cm⁻¹;

¹H NMR(CDCl₃) δ 1.68(s, 3H, CH₃CO), 5.05(d, *J* = 4.5 Hz, 1H, C3H),

5.88(dd, *J* = 2.6 amp; 4.5 Hz, 1H, C4H), 6.25(s, 1H, NH),

7.29-7.39(m, 5H, Ar);

¹³C NMR(CDCl₃) δ 19.7, 57.9, 78.3, 127.5, 127.7, 128.2, 128.5, 134.7,

165.6(β -lactam CO), 169.0(acetoxy CO);

CIMS, m/z 205(M⁺), 106(base).

실시예 9 : 세포표면 발현된 리파제를 이용한 라세미 베타-락탐, 라세미 시스-3-아세톡시-4-페닐아제티딘-2-온의 광학분할

세포표면발현 리파제로서 대장균 XL1-Blue에 세포표면 발현된 리파제를 사용한 것을 제외하고는, 실시예 8과 동일한 방법을 사용하여, 키랄성 베타-락탐, 7mg의 (-)-시스-3-하이드록시-4-페닐아제티딘-2-온(수율 35%)과 6mg의 (-)-시스-3-아세톡시-4-페닐아제티딘-2-온(수율 30%)을 수득하였다.

(-)-시스-3-하이드록시-4-페닐아제티딘-2-온

$[\alpha]_D -128^\circ$ (c 0.5, CH₃OH);

¹H NMR(CDCl₃ and DMSO-d₆) δ 3.60(s, 1 H, OH),

4.95(d, $J = 4.7$ Hz, 1 H, C3 H), 5.88(d, $J = 4.7$ Hz, 1 H, C4 H),

6.22(s, 1 H, NH), 7.27-7.40(m, 5 H, ArH);

¹³C NMR(CDCl₃ and DMSO-d₆) δ 58.6, 79.1, 127.6, 128.1, 137.1, 170.5;

CIMS, m/z 163(M⁺), 91(base).

(-)-시스-3-아세톡시-4-페닐아제티딘-2-온

$[\alpha]_D -28^\circ$ (c 1, CHCl₃);

IR (KBr) 3200, 1750, 1720 cm⁻¹;

¹H NMR(CDCl₃) δ 1.68(s, 3 H, CH₃CO), 5.05(d, $J = 4.5$ Hz, 1 H, C3 H),

5.88(dd, $J = 2.6$ and 4.5 Hz, 1 H, C4 H), 6.25(s, 1 H, NH),

7.29-7.39(m, 5 H, Ar);

¹³C NMR (CDCl₃) δ 19.7, 57.9, 78.3, 127.5, 127.7, 128.2, 128.5, 134.7,

165.6((β -lactam CO), 169.0(acetoxy CO);

CIMS, m/z 205(M⁺), 106(base).

상기 실시예 7 내지 9에서 보듯이, 세포표면에 발현된 리파제는 정상적으로 발현되어 키랄화합물의 제조에 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 회수가 용이하여, 키랄 화합물의 제조공정을 단순화시킬 수 있었다.

이에, 본 발명자들은 리파제를 발현시킬 수 있는 plackSC-lip을 대장균 MC4100에 도입하여 제조된 형질변환체를 대장균 MC4100/plackSC-lip(*Escherichia coli* MC4100/plackSC-lip)라 명명하고, 이를 2000년 11월 30일자로 국제기탁기관인 생명공학연구원(KRIBB) 유전자은행(KCTC, 대한민국 대전광역시 유성구 어은동 소재)에 기탁번호 KCTC-0898BP로 기탁하였다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 세포표면에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 고안된 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)에서 유래한 세포 외막 단백질 C의 변형된 유전자, 전기 유전자를 세포표면 발현 모체로 사용하여 외래 단백질이나 펩타이드를 세포표면에 효율적으로 발현시킬 수 있는 발현벡터, 전기 발현벡터에 의하여 형질변환된 미생물 및 그를 이용하여 외래 단백질을 박테리아의 세포표면에 효율적으로 발현시키는 방법을 제공한다. 본 발명에 의하면, 세포 외막에 외래 단백질을 정상적인 기능을 가진 상태로 발현시킬 수 있으므로, 삽입되는 외래 유전자에 따라 생물학적 변환, 재조합 생백신, 여러 펩타이드나 항체의 선별, 중금속 제거 또는 폐수 처리에 응용할 수 있는 전세포 흡착제에 이용되는 효소 혹은 단백질을 세포표면에 안정적으로 발현시켜 지속적으로 촉매의 활성의 감소 없이 안정되게 사용할 수 있는 전세포 생물변환 등의 목적에 유용하게 사용할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

세포외막 단백질 C(OmpC)의 N-말단으로부터 7번째 루프에 이르는 아미노산 서열을 암호화하는 유전자, lac 프로모터, 카나마이신 유전자 및 리파제 유전자를 포함하고, 도 7로 나타내어지는 리파제의 세포표면 발현벡터 plackSC-lip.

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

제 4항의 발현벡터 plackSC-lip가 대장균 MC4100에 도입되어 형질변환된 대장균 MC4100/plackSC-lip(*Escherichia coli* MC4100/plackSC-lip)(KCTC-0898BP).

청구항 8.

삭제

청구항 9.

제 7항의 형질변환된 대장균 MC4100/plackSC-lip(KCTC-0898BP)을 배양하고, 전기 대장균의 표면에 발현된 리파제를 수득하는 공정을 포함하는 세포표면 발현 리파제의 제조방법.

청구항 10.

삭제

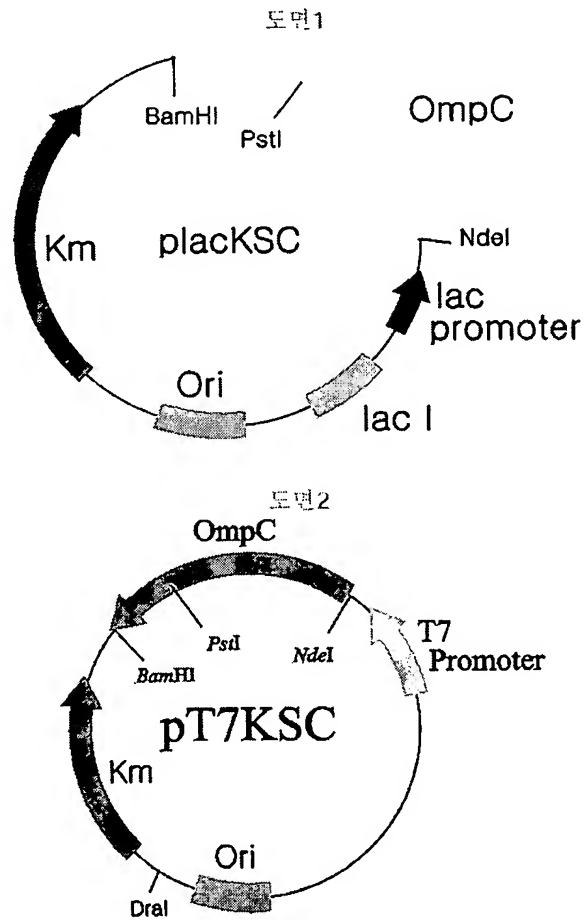
청구항 11.

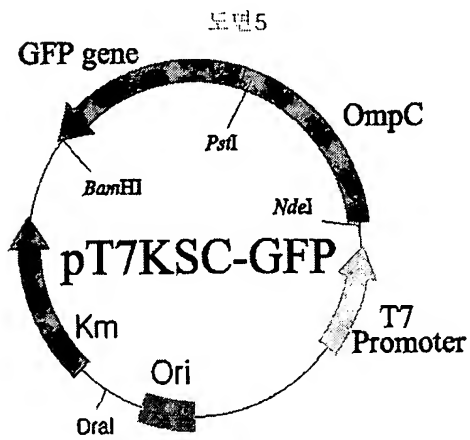
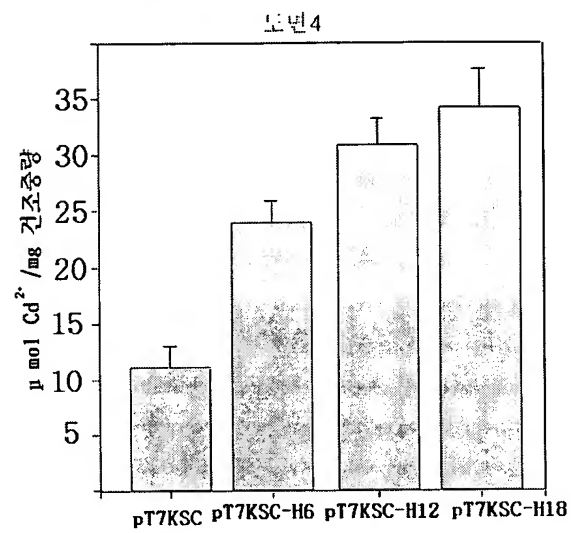
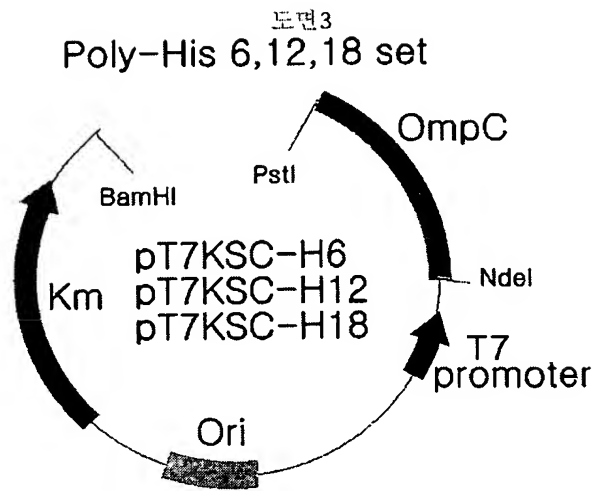
제 7항의 형질변환된 대장균 MC4100/placKSC-lip(KCTC-0898BP)을 이용하여, 라세미 에스테르 화합물을 광학분할함으로써, 키랄성 에스테르, 키랄성 유기산 또는 키랄성 알코올을 제조하는 단계를 포함하는 키랄성 화합물의 제조 방법.

청구항 12.

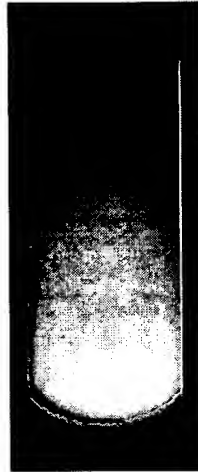
제 11항에 있어서,
라세미 에스테르 화합물은 하이드록시카르복실산 알킬 에스테르
또는 락탐인 것을 특징으로 하는
키랄성 화합물의 제조방법.

도면

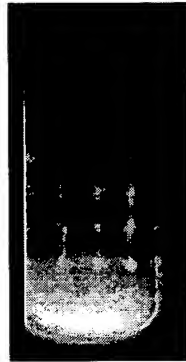




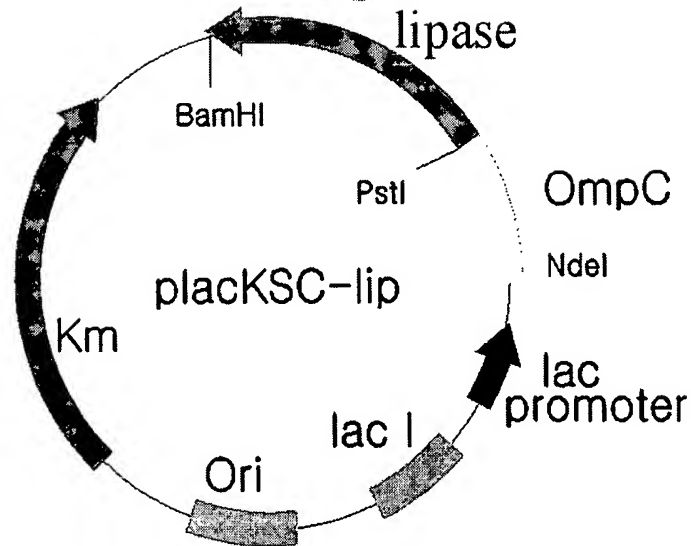
도면6a



도면6b



도면7



<110> Korean Advanced Institute of Science and Technology <120> Gene for Cell-surface Expression <
 160> 12 <170> KopatentIn 1.6 <210> 1 <211> 34 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220
 > <223> primer1 <400> 1 ggaattccat atgtgttcc tgtgtgaaat tggt
 34 <210> 2 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer2 <400> 2 tg
 ctcacatg ttctttctg 20 <210> 3 <211> 32 <212>
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer3 <400> 3 gcggtacatt taaagccacg ttgtgtctca a

a
 32 <210> 4 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequen
 nce <220> <223> primer4 <400> 4 cgaattctta gaaaaactca tcgagca
 27 <210> 5 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer5 <400>
 5 ggaattccat atgaaagtta aagtactg 28 <210> 6 <211> 3
 0 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer6 <400> 6 ccgggatacct tattagaact ggta
 aaccag 30 <210> 7 <211> 49 <212> DNA <213> Artificial
 al Sequence <220> <223> primer7 <400> 7 gatagatatc ctgcaggtcg acccaagcgg acatcaccat catcaccat
 49 <210> 8 <211> 45 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> prime
 r8 <400> 8 ccgggatacct tattactcga gaccagaatg gtgatgatgg tgatg 45 <210> 9 <2
 11> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer9 <400> 9 aactgcagag taaagga
 gaa gaacttttc 29 <210> 10 <211> 29 <212> DNA <213>
 Artificial Sequence <220> <223> primer10 <400> 10 ccgggatacctt attttagag ctcacccat
 29 <210> 11 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <2
 23> primer11 <400> 11 acctgcagat cacgttgat acctatcaca 30
 <210> 12 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer12 <400> 12 g
 cggatccaa aactcagcac cgtatcg 27